

Lyhytkestoisen univajeen vaikutus ihmisen immuunijärjestelmän toimintaan

Eero Hietanen, LK

Biolääketieteen laitos, fysiologian laitos

Helsinki pvm 16.11.2020

Tutkielma

eero.hietanen@helsinki.fi

Ohjaaja: Tarja Stenberg

Helsingin Yliopisto

Lääketieteellinen tiedekunta

HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Lääketieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Biolääketieteen laitos	
Tekijä – Författare – Author Eero Hietanen			
Työn nimi – Arbetets titel – Title Lyhytkestoisen univajeen vaikutus ihmisen immuunijärjestelmän toimintaan			
Oppiaine – Läroämne – Subject Lääketiede			
Työn laji – Arbetets art – Level Tutkielma	Aika – Datum – Month and year 16.11.2020	Sivumäärä – Sidoantal - Number of pages 35	
<p>Tiivistelmä – Referat – Abstract</p> <p>Unen ja immuunijärjestelmän välillä tiedetään olevan dualistinen yhteys. Unen laatu muuttuu, mikäli ihminen sairastuu infekioon ja toisaalta tiedetään myös, että univajeessa tapahtuu immuunijärjestelmän aktivaatiota ilman samanaikaista tulehdusta. Epidemiologisissa tutkimuksissa univajeen on todettu olevan yhteydessä lukuisiin etenkin länsimaissa merkittäviin sairauksiin, kuten sydän- ja verisuonisairauksiin, diabetekseen ja liikalihavuuteen. Myös tiettyjen tulehdusmarkkerien tiedetään olevan koholla näissä sairauksissa. Onkin pohdittu onko immuunijärjestelmän aktivaatio se mekanismi, jolla univajeen yhteys näihin sairauksiin olisi osittain selitettävissä.</p> <p>Tässä tutkielmassa kuvataan tutkimusasetelma, jonka tavoitteena oli selvittää voidaanko jo yhden yön totaalisen univajeen seurauksena todeta muutoksia keskeisten tulehdusmarkkerien geeniekspressiossa perifeerisen veren valkosoluissa. Tutkimus toteutettiin kokeellisena tutkimuksena, johon osallistui 18 vapaaehtoista 19–29 vuotiasta miestä. Koehenkilöt nukkuivat yhden yön laboratoriossa ja tämän jälkeen he olivat valveilla yhtäjaksoisesti 36 tunnin ajan. Koehenkilöt toimivat omina kontrolleinaan ja verinäytteet kerättiin kontrollinäytteiden osalta nukutun yön jälkeen klo 7.30 ja 19.30 ja valvotun yön jälkeen samoina kellonaikoina. Geeniekspression osalta mittausten tuloksia ei ole tällä hetkellä käytettävissä.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Sleep deprivation; Immunity, innate; Gene expression; Inflammasomes			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited			
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information			

Sisällys

Sisällys	ii
1 Johdanto	1
2 Kirjallisuuskatsaus	3
2.1 Uni	3
2.2 Immuunijärjestelmän toiminta	10
2.3 Uneen vaikuttavat sytokiinit	13
2.4 Toll-like reseptorit	18
2.5 NLRP3 ja inflammasomi	19
2.6 Univajeen vaikutukset immuunijärjestelmän komponentteihin	21
3 Tutkimuksen tavoitteet	23
4 Menetelmät ja aineisto	24
4.1 Koehenkilöt	24
4.2 Koeasetelma	24
4.3 Unen ja valveen mittaaminen	25
4.4 Verinäytteet	27
4.5 Oma osuus tutkimuksen teossa	28
5 Tulokset	28
5.1 Tutkimusta edeltävät viikot	28
5.2 EEG-mittaukset	29
5.3 Tutkittavien vireystilan arviointi	29
5.4 Immuunijärjestelmän solujen geeniekspressio	29
6 Pohdinta	30
6.1 Tulokset	30
6.2 Tulkinta ja virhelähteet	30

6.3 Jatkossa	31
Lähteet	32

1 Johdanto

Uni on yksi ihmisen perustarpeista. Evolutiivisesti uni on vanha ominaisuus, sillä lähes kaikilla monimutkaisilla eläinlajeilla havaitaan unikäyttäytymistä. Unta onkin tutkittu paljon, mutta silti perimmäinen syy unen kehittymiselle on yhä tuntematon.

Ihmiselle unella on keskeinen merkitys. Jopa kolmasosa koko ihmiselämästä menee nukkuessa. Unen palauttava vaikutus on kiistaton. Jos ihminen nukkuu hyvin, on hän valpas ja virkeä. Univajeessa puolestaan ajatustoiminta hidastuu, ympäristön havainnointi vaikeutuu ja ihminen tuntee unipainetta. Mikäli unta ei saa lainkaan, voi se johtaa jopa kuolemaan, mikä on osoitettu muun muassa eläinkokein. (1)

Unen keskeiset vaikutukset liittyvät aivojen toimintaan. Hermoverkot uusiutuvat turhien synapsiyhteyksien karsiutuessa nimenomaan unen aikana ja tämä mahdollistaa esimerkiksi oppimisen (2). Nykyään ymmärretään, että unella on vaikutusta koko kehon toimintaan. Univaje on uhka elimistölle ja aiheuttaa stressireaktion. Tämän vuoksi myös immuunijärjestelmä aktivoituu synnyttäen tulehdustilan. Univaje on myös yhteydessä moniin sairauksiin, kuten sydän- ja verisuonisairauksiin (3), aikuistyyppin diabetekseen (4), ja liikalihavuuteen (5). Nämä sairaudet ovat etenkin teollisuusmaissa johtavia kuolinsyitä. Kokeellisissa tutkimuksissa on havaittu, että unen rajoittaminen aiheuttaa immuunipuolustuksen aktivoitumisen. Tulehdusreaktioon liittyvien sytokiinien (6) ja C-reaktiivisen proteiinin (CRP) (7),(8) tasojen nousua ja transkriptiotekijä nuclear factor kappa B:n (NF- κ B) aktivaatiota (9),(10) on raportoitu tutkimuksissa. Tulehdusmarkkerien pitkäaikainen kohoaminen on yhteydessä kroonisiin sairauksiin kuten diabetekseen ja sydän- ja verisuonisairauksiin. (11)

Karkeasti ihmisen ja muiden kehittyneiden eläinten immuunijärjestelmän voi jakaa kahteen osaan: luontaiseen (synnynnäinen, innate) immuunijärjestelmään ja hankittuun eli adaptiiviseen (acquired, opittu) immuunijärjestelmään. Immuunijärjestelmän aktivoituessa inflammatoristen sytokiinien, interferonien, kemokiinien ja vasoaktiivisten eli verisuonten supistumiseen vaikuttavien aineiden, määrä lisääntyy ja tämä johtaa immuunivasteeseen. Luontaisen immuunijärjestelmän solut toimivat muun muassa hahmontunnistukseen pohjautuvilla keinoilla valkosolujen pintarakenteiden tunnistuessa vierasperäisiä rakenteita, esimerkiksi bakteerin tai virusten pintaproteiineja, hahmontunnistusreseptorien (Toll-like receptors, TLR) avulla. (12) Hankinnainen immuunijärjestelmä on puolestaan monimutkainen järjestelmä, jossa lymfosyytit tunnistavat niille esiteltyjä vierasmateriaaleja, tunnistaneet yksilöt alkavat monistua, ja uhan mentyä ohi jäävät muistisoluiksi seuraavaa kohtaamista varten, jolloin puolustusreaktio käynnistyy nopeammin. (13)

Lukuisien sytokiinien on todettu lisäävän unta ja uneliaisuutta. Niiden tuotanto lisääntyy paitsi infektioissa, myös univajeen aikana. Riittämätön uni käynnistää siis elimistössä vastaavanlaisen vaarasignaalin kuin tulehdustilat ja tähän liittyy sekä immuunijärjestelmän aktivaatio että aineenvaihdunnan muutokset. Tärkeimpiä uneen vaikuttavia sytokiineja ovat IL-1 β , IL-6 ja TNF (tumor necrosis factor). (14) Lyhytkestoisen univajeen on ajateltu vaikuttavan lähinnä synnynnäisen immuunijärjestelmän toimintaan, kun taas pitkäkestoisen univajeen on todettu vaikuttavan myös hankinnaisen immuunijärjestelmän toimintaan sekä matala-asteisen tulehduksen syntyyn.

Ryhmän aiemmassa tutkimuksessa (15) on osoitettu usean päivän osittaisen univajeen vaikuttavan lukusiin immuunijärjestelmään liittyvien geenien aktivaatioon. Tässä tutkielmassa kuvataan koeasetelma, jolla haluttiin muun muassa selvittää näkyykö vastaavia muutoksia geeniaktivaatiossa jo yhden kokonaisen yön kestoisen univajeen jälkeen kokeellisissa olosuhteissa.

2 Kirjallisuuskatsaus

2.1 Uni

2.1.1 Uni

Uni on eläinlajeilla tavattava tila, jossa tyypillisesti ympäristön havainnointi ja kommunikaatio sen kanssa vähenevät. Kyseessä ei kuitenkaan ole passiivinen tila, vaan aivot ja keho ovat aktiivisia ja uni aiheuttaa joukon muutoksia fysiologisissa toiminnoissa. Uni voidaan jakaa karkeasti kahteen erilaiseen vaiheeseen, NREM- ja REM-uneen. NREM-uni jakautuu asteisiin kevyemmästä unesta syvään uneen. Unen syvetessä lihastonus asteittain vähenee ja REM-unessa puolestaan vallitsee lihaslama.

Kehittyneemmillä eläimillä on kullakin omat tunnusomaiset merkit unesta: tyypillisesti sen aikana pysytään jokseenkin liikkumattomana ja kehon liikkeitä inhiboidaan aivotasolla. Aivoissa talamus ei päästä aistitietoa niin herkästi läpi aivokuorelle, jonka vuoksi vuorovaikutus ympäristön kanssa vähenee. Voimakkaiden ärsykkeiden seurauksena voi tapahtua kuitenkin herääminen unesta. Uni eroaakin varsinaisesta tajuttomuudesta siten, että se pystytään helposti lopettamaan

Uni ei vähennä aktiivisuutta kaikkialla aivoissa, vaan osassa aivojen tumakkeista aktiivisuus voi olla myös suurempaa kuin valveessa. Unen määrittäminen ei myöskään ole täysin suoraviivaista, sillä fysiologisena prosessina se on tietynlainen tasapainotila, ja siirtyminen unesta valveille ja valveesta uneen ei tapahdu täysin yhtäaikaisesti koko aivoissa. Unen säätelyssä voidaan erotella kaksi erillistä komponenttia: homeostaattinen ja sirkadiaaninen. Homeostaattinen komponentti aiheuttaa unipainetta pitkittyneen valveillaolon jälkeen ja tällöin unen kesto ja intensiteetti voi olla suurentunut. Vastaavasti lyhyen valveen jälkeen unipaine on pieni. Sirkadiaaninen komponentti koostuu elimistön sisäisen kellon tuottamista rytmittävistä muutoksista elimistön eri fysiologisiin toimintoihin, kuten hormonieritykseen ja uni-valverytmiin. Sirkadiaaninen komponentti myös määrittelee unen ajoituksen suhteessa vuorokauden aikaan ja erityisesti valoisuuteen. Ihmisellä uni ajoittuu sen ansiosta pimeään aikaan, kun taas esimerkiksi jyrsijöillä usein valoisaan aikaan. Lisäksi unessa on eroteltavissa niin sanottuja ultradiaanisia (tiheämmin kuin vuorokausittain ilmeneviä) rytmejä, näitä ovat esimerkiksi yllä mainittujen unen vaiheiden rytmitys. (16)

2.1.2 Unen anatomia

Unen säätely voidaan yhdistää aivoissa tiettyihin anatomisiin alueisiin. Tänä päivänä tunnetaan lukuisia tarkasti paikannettuja alueita aivoissa, jotka säätelevät tai ylläpitävät unta. Näitä ovat esimerkiksi hypothalamus ja sen suprakiasmaattinen tumake, aivorunko, talamus, käpylisäke, etuaivojen basaaliosat (basal forebrain) ja amygdala.

Sirkadiaanisten rytmien tahdistus tapahtuu hypothalamuksen suprakiasmaattisessa tumakkeessa. Tähän tahdistimeen vaikuttaa ulkoiset tekijät, joista merkittävin on valo. Myös sosiaaliset vihjeet antavat tietoa tälle tahdistimelle. Näiden viestien avulla elimistö päättää milloin on oikea aika valmistautua uneen. Sirkadiaanisessa säätelyssä on aivojen tiettyjen alueiden lisäksi osana myös monia muita elimistön kudoksia, joissa tapahtuu omia vuorokaudenaikaan liittyviä prosesseja, jotka vaikuttavat uni-valverytmiin. Näitä kutsutaan myös perifeerisiksi kelloiksi.

Unen homeostaattinen säätely puolestaan on yhdistetty hypothalamuksen preoptiseen alueeseen. Unen säätelyssä on mukana unipainetta aiheuttavien preoptisten alajärjestelmien sekä valvetta edistävien etuaivojen alaosien, hypothalamuksen ja aivorungon alajärjestelmien keskinäiset yhteydet. Ultradiaanisten rytmien säätelyn katsotaan tapahtuvan rostraalisessa aivorungossa.

Vaikka näitä järjestelmiä usein käsitellään erillisinä, ovat ne tiiviissä yhteydessä keskenään anatomisesti sekä funktionaalisesti. (17),(18)

2.1.3 Unen tutkiminen

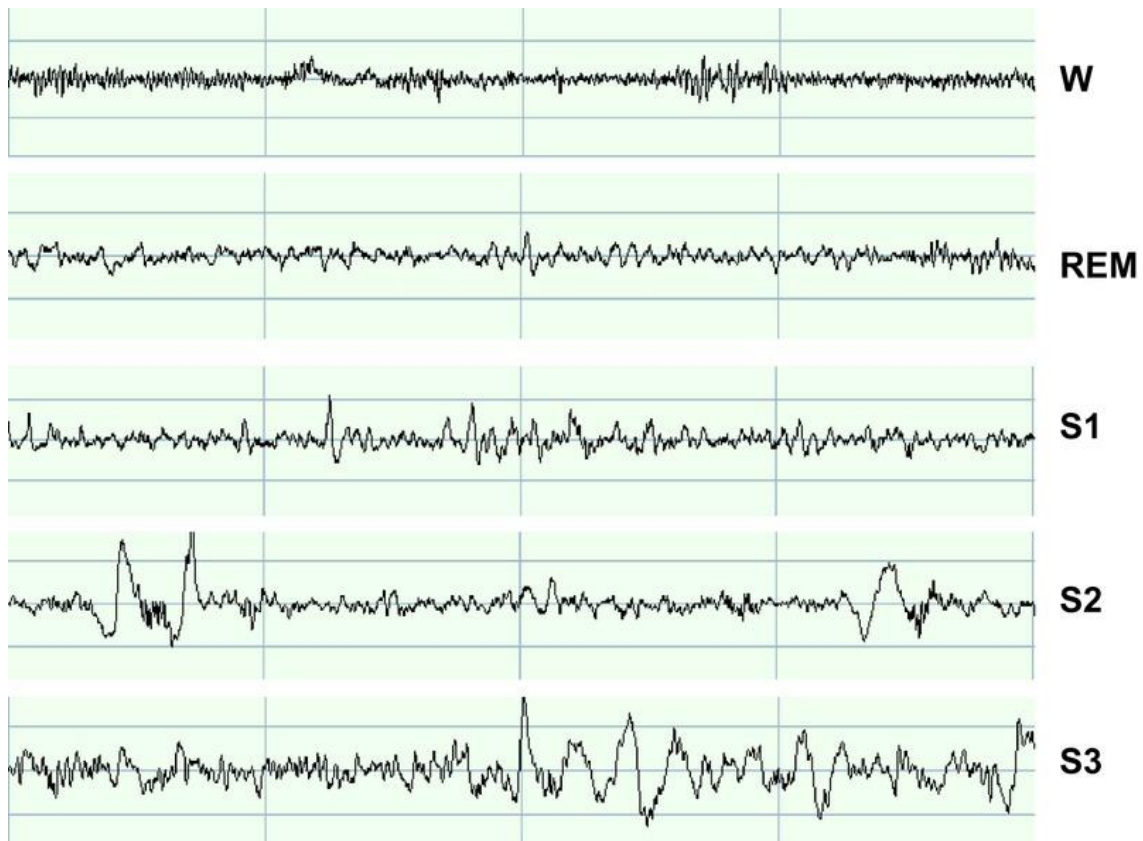
Uni määritellään ja mitataan aivosähkökäyrästä (EEG) siinä ilmenevien heilahtelujen (oskillaatio), perusteella. Aivosähkökäyrästä voidaan osoittaa erilaisissa unen vaiheissa erityyppinen karakteristinen aktiviteetti. Unen vaiheiden määrittelyssä käytetään lisäksi lihasjännityden mittaamista ja silmäliikkeiden mittaamista. EEG perustuu jännitteen mittaamiseen ajan funktiona. Jännite-erot syntyvät aivojen toiminnasta, jossa lukuisat neuronit ovat yhteydessä toisiinsa ja ovat sähköisesti aktiivisia. Näiden neuronien sähköisen toiminnan yhteissummaa pystytään aivojen, kallon ja sen päällä olevan ihon päältä mittaamaan. Tähän edellytyksenä on se, että neuronit toimivat synkronoidusti, sillä yksittäisten neuronien aiheuttamat jännitteet ovat häviävän pieniä ja ilman synkroniaa signaali kumoutuu pois. (19) Jännite vaihtelee myös nopeasti, joten mittaustajuuuden täytyy olla riittävän suuri. Yleensä 200 Hz riittää tähän. (20) Lihasjännityden mittaaminen (elektromyografia EMG) ja silmänliikkeiden mittaaminen (elektro-okulografia EOG) perustuvat samaan periaatteeseen, mutta sen sijaan että niissä mitattaisiin neuronien aiheuttamaa jännitettä, ne mittaavat halutun lihaksen sähköisestä toiminnasta aiheutuvia jännitteitä. (21)

2.1.4 Unen vaiheiden arviointi

EEG-tutkimuksessa (sisältäen EOG:n ja EMG:n) saadusta univalvekäyrä voidaan erottaa karkeasti kolmen tyyppistä vireysastetta: valve, non-rapid eye movement (NREM) -uni ja rapid eye movement (REM) -uni. NREM -uni voidaan vielä jakaa kolmeen unen vaiheeseen, joista käytetään merkintöjä N1-N3 (kuva 1). Aiemmin käytössä oli vaiheet S1-S4, joissa nykyinen N3 oli vielä eroteltu kahdeksi alaryhmäksi, S3 ja S4, mutta tästä jaottelusta on luovuttu. Unen vaiheita arvioidaan tyypillisesti ihmisiltä 30 s pituisista ajanjaksoista kerrallaan ja mikäli tällaisessa ajanjaksossa on johonkin unen vaiheeseen sopivat löydökset yli puolet ajasta, tulkitaan koko 30 s jakso kyseiseksi unen vaiheeksi. (20)

NREM-unessa on valvetilaan verrattuna alentunut perustaajuus, mutta suurentunut amplitudi. Tämä johtuu aivojen valvetta synkronisemmasta toiminnasta. N1-vaihe on yleensä unen ensimmäinen vaihe nukahtamisen jälkeen. Lihasjännitys on yhä varsin suuri ja silmissä voidaan nähdä hitaita liikkeitä. Unen syvetessä päästään seuraavaksi vaiheeseen N2. Tässä EEG:n perustaajuus alenee entisestään ja EEG:ssä nähdään ajoittaisia muutoksia, unisukkuloita ja K-komplekseja, jotka ovat karakteristisia tälle unen vaiheelle. Unisukkula on muutaman sekunnin kestoinen purkaus, jonka taajuus on 12-15 Hz ja K-kompleksi yksittäinen selvästi korkea-amplitudisempi piikki. Silmänliikkeet ovat N2-vaiheessa vähäisiä ja lihastonus selvästi alentunut. N3 on unen vaiheista syvin. Sille tyypillinen EEG-löydös on hidastaajuuksinen (≤ 4 Hz), mutta korkea-amplitudinen synkroninen käyrä. Mikäli 30s mittaisesta arviointijaksosta vähintään 20% sisältää hidastaajuuksista käyrää, tulkitaan kyseinen jakso N3-vaiheeksi. (20)

REM-unessa ihminen näkee yleensä unia ja tällöin myös silmät liikkuvat, toisin kuin muissa univaiheissa. Tästä vaihe on myös saanut nimensä (rapid eye movement, vilkeuni). EEG muistuttaa valvetta, mutta silmien liikuttajalihaksia sekä hengityslihaksia lukuunottamatta tahdonalaisten lihasten lihasjännitys on tyypillisesti alhainen. Silmien liike on myös äkkinäistä ilman hitaampia liikkeitä välissä, mistä sen voi myös erottaa verrattuna valvetilaan. (20)

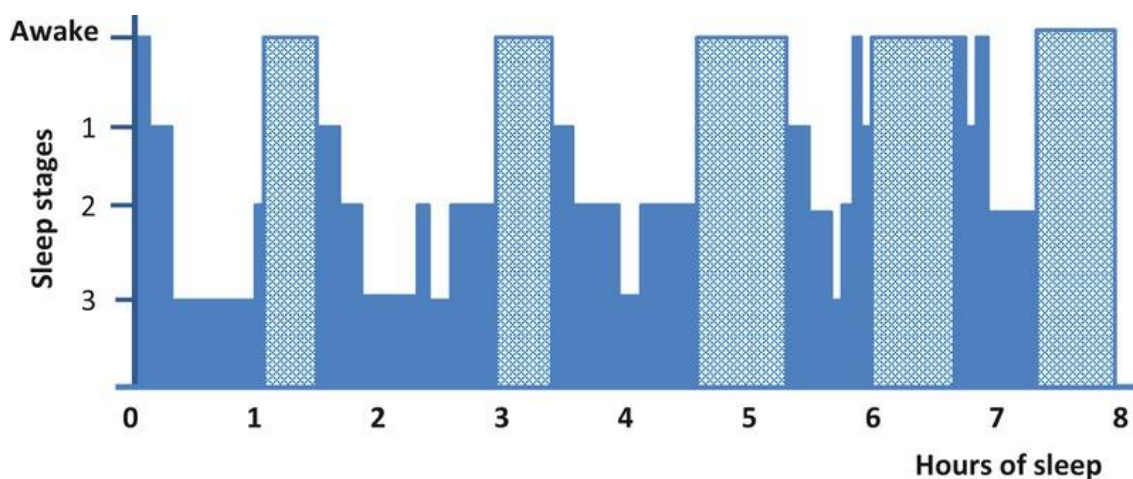


Kuva 1 (18). Unen eri vaiheiden ilmentymät EEG:ssä. W on valve (wake). S1-S3 vastaavat vaiheita N1-N3.

Unen vaiheet aiheuttavat aivosähkökäyrän lisäksi myös mitattavissa olevia muutoksia muuallakin kehossa autonomisen hermoston aktivaation tason vuoksi. NREM-unessa syke ja verenpaine laskevat ja myös hengitysfrekvenssi alentuu. Myös ruumiinlämmössä voidaan havaita laskua. REM-unen aikana autonomisen hermoston toiminta on puolestaan epäsäännöllistä ja syke, verenpaine sekä hengitysfrekvenssi muuttuvat epäsäännöllisesti. Varmaa syytä tälle ei tunneta, mutta asia todennäköisesti liittyy unien näkemiseen, jonka on osoitettu vaikuttavan sympaattisen hermoston aktivaation tasoon.

(18)

Unen vaiheet tyypillisesti seuraavat toisiaan tietyssä järjestyksessä. Nukahtaminen johtaa yleensä N1-vaiheen alkamiseen, josta uni syvenee N2-vaiheen kautta syvään uneen, eli vaiheeseen N3. REM-uni alkaa tyypillisesti vaiheen N3 jälkeen. REM-unesta usein joko herätään lyhytaikaisesti tai uni syvenee uudelleen. Unen aikana voi olla useitakin heräämisiä ilman, että nukkujalla itsellään on mitään muistikuvaa tästä jälkikäteen. Uni voi myös syventyä nopeastikin jättäen jonkun vaiheen väliin. Tyypillisessä noin 8h mittaisessa yöunessa on noin 5 NREM-REM sykliä, jotka kukin kestävät noin 90 minuuttia. REM-unta on yleensä vähän alkuyöstä ja enenevässä määrin aamun lähestyessä. Unen vaiheita kuvataan usein hypnogrammilla, jossa univaiheet esitetään ajan funktiona (kuva 2). Tästä nähdään yhdellä silmäyksellä univaiheiden järjestys ja kesto yhden yön aikana sekä mahdollisen yönaikaisen valveen määrä.



Kuva 2 (18). Hypnogrammi. Sinisellä valve ja univaiheet N1-N3. Kuviolliset palkit kuvaavat REM-unta.

Unen mittaamisen kultainen standardi on polysomnografia (PSG). Siinä EEG:n, EMG:n ja EOG:n lisäksi voidaan seurata syketaajuutta, hengitystoimintaa sekä happisaturaatiota. Kannettavin laittein tämä pystytään suorittamaan myös kotiolosuhteissa. Pidemmän ajan seurannassa apuna voidaan käyttää aktigrafia, jolla voi arvioida unen kestoa, unilatenssia, ja unen fragmentaatiota. Se ei kuitenkaan pysty luotettavasti ilmaisemaan onko tutkittava todellisuudessa unessa vai vain liikkumaton. Muita keinoja unen arviointiin ovat esimerkiksi unipäiväkirja ja kyselytutkimukset. Näissä on kuitenkin mukana vahva subjektiivinen komponentti, joka täytyy huomioida niitä käytettäessä.

2.1.5 Univaje ja sen tutkiminen

Univaje on tila, jossa ihminen saa omaan unen tarpeeseensa nähden riittämättömästi unta. Riittävän unen määrittäminen on hankalaa, sillä asian suhteen on runsaasti yksilöllistä vaihtelua. Karkeasti voidaan ajatella unen määrän olevan riittävä, jos ihminen herää unen jälkeen spontaanisti ja virkeänä ja vireystila säilyy siihen saakka, kun ihmisen pitää uudelleen mennä nukkumaan. Aikataulutetussa yhteiskunnassa ajatus spontaanista heräämisestä virkeänä on monelle mahdoton, joten tämä ei sovi yleistetyksi määritelmäksi tutkimusta tehdessä, sillä enemmistö ihmisistä olisi sen mukaan jatkuvassa univajeessa. Univajetta voidaan myös jakaa eri tyyppeihin sen mukaan, kuinka suuri osa yönestä menetetään: osa vai kokonainen yö; tai keston mukaan: lyhytaikainen ja pitkäaikainen univaje. Pitkäaikaista totaalia univajetta ei voi olla kovinkaan pitkäkestoisesti, sillä se on eläinkokeiden ja tiettyjen perinnöllisten sairauksien tarkastelun perusteella fataalia. (1) Sen sijaan osittainen univaje sekä lyhyt- että pitkäkestoisena on yleinen ilmiö esimerkiksi vuorotyön tekijöillä, sairastaessa ja pienten lasten vanhemmilla. Jokainen ihminen kärsii elämänsä aikana univajeesta jossain vaiheessa.

Univajeen tutkimisessa voidaan käyttää epidemiologisia tutkimuksia tai kokeellisia tutkimuksia. Tutkimuksen kohteena voi olla lyhyt -tai pitkäaikainen univaje ja lisäksi osittainen tai totaalinen univaje. Tutkimuksen tekoa ennen päätetään, minkälaista univajetta halutaan tutkia. Kokeellisia tutkimuksia voidaan tehdä myös eläimillä, esimerkiksi rotilla. Eläinmalleissa voidaan saada hyödyllistä tietoa esimerkiksi välittäjäainepitoisuuksista eri aivoalueilla tai hormonipitoisuuksista veressä. Huono puoli niissä on se, että eläin ei kykene kertomaan kokeeko itseään väsyneeksi ja lievässä väsymyksessä sitä on hankala päätellä myöskään sen toiminnasta. Eläinmalleilla voidaan kuitenkin ihmismalleja nopeammin tutkia univajeen pitkäaikaisvaikutuksia, sillä eläimiä voidaan pitää univajeessa suuria osia niiden elämästä.

2.2 Immuunijärjestelmän toiminta

Immuunijärjestelmä on kehon puolustusjärjestelmä, joka tunnistaa ja tuhoaa ulkoisia ja sisäisiä uhkatekijöitä. Immuunijärjestelmä toimii kehon kaikissa osissa. Immuunijärjestelmä on jaettavissa luontaiseen (synnynnäinen, innate) immuunijärjestelmään ja hankittuun eli adaptiiviseen (opittu) immuunijärjestelmään. Luontainen immuunipuolustus muodostaa elimistön ensilinjan puolustuksen, jonka tehtävä on estää mikrobien pääsy kudoksiin ja verenkiertoon. Luontainen järjestelmä ei kuitenkaan aina riitä tämän toteutumiseksi ja sen vuoksi on kehittynyt myös hankittu immuunijärjestelmä, joka kykenee spesifisemmin torjumaan taudinaiheuttajia.

2.2.1 Luontaisen immuunijärjestelmän komponentit

Luontaiseen immuunijärjestelmään kuuluu erilaiset fysikaalis-kemialliset yleispuolustusmekanismit, spesifimmin immuunijärjestelmään kuuluvat molekyylit sekä luontaisen immuunijärjestelmän solut. Yleispuolustusmekanismeja ovat epiteelien (mukaan lukien iho) ja limakalvojen aiheuttama mekaaninen este, kehon ulkopintojen eritteet, eritteiden mekaaninen poistuminen, mahan ja emättimen matala pH sekä erilaiset entsyymit. Luontaisen immuunijärjestelmän molekyylejä ovat komplementtijärjestelmän proteiinit, tunnistinmolekyylit, mikrobeja tuhoavat peptidit, viestintämolekyylit ja tulehduksen välittäjäaineet. Soluista synnynnäisen immuunijärjestelmän osana toimivat granulosyytit (neutrofiilit, eosinofiilit ja basofiilit), monosyytit, dendriittisolut sekä epäspesifit lymfosyytit kuten natural killer (NK) – solut. Veressä kiertävistä monosyyteistä tulee kudokseen päästyään makrofageja, esimerkiksi Langerhansin soluja ihossa tai mikroglia soluja aivokudoksessa. (13)

2.2.2 Opitun immuunijärjestelmän komponentit

Opittu immuunijärjestelmä on selkärankaisille kehittynyt hienovarainen ja spesifimpi kyky tunnistaa vieraita antigeenejä eli kohderakenteita. Opitun immuniteetin keskeiset tekijät ovat B-lymfosyyteistä kehittyvien plasmasolujen tuottamat vasta-aineet sekä T-lymfosyytit, jotka tunnistavat antigeenisia peptidejä spesifisti pinnallaan olevien T-solureseptorien avulla. T-solut jaetaan pintarakenteen mukaan alaluokkiin, joista tärkeimmät ovat CD4- ja CD8- T-solut. Ensimmäisen antigeenikontaktin yhteydessä opitun spesifin immuunivasteen muodostuminen kestää 1-2 viikkoa, mutta tästä immuunivasteesta jää jälkeen immunologinen muisti, joka mahdollistaa nopean ja voimakkaan reaktion seuraavan kerran kun antigeeni kohdataan. Tähän perustuu myös immuniteetti tiettyjä patogeenejä vastaan joko sairastetun infektion tai rokotuksen jälkeen. (13)

Opitun immuunijärjestelmän kyky tuottaa spesifisesti antigeeniä tunnistavia T-soluja ja spesifisti antigeeniin sitoutuvia vasta-aineita perustuu vasta-ainegeenien ja T-solureseptorigeenien uudelleenjärjestelyyn, somaattisiin mutaatioihin ja parhaiten antigeeniä tunnistavia reseptorimolekyylejä kantavien solujen selektioon. Järjestelmä on muokkautuva ja mahdollistaa monimuotoisen tunnistusvalikoiman. (13)

2.2.3 Tulehdusvasteen synty

Patogeenin päästessä immuunijärjestelmän yleispuolustusmekanismien läpi, kohtaa se kudoksissa kudismakrofageja. Ne tunnistavat patogeenin uhaksi hahmontunnistusreseptorien (PRR, pattern recognition receptor) avulla. TLR:t (toll like receptors) ovat tärkeä ryhmä näitä hahmontunnistusreseptoreita. PRR tunnistaa elimistölle vieraita rakenteita (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) mikrobeista kuten viruksista ja bakteereista, sekä myös elimistöstä itsestään peräisin olevia vaurioon viittaavia rakenteita (danger/damage associated molecular pattern, DAMP), jotka vapautuvat vaurioituneista tai uhatuista soluista. PRR saavat aikaan tulehdusvasteen aktivoimalla signalointireittejä, kuten inflammasomin tai NF- κ B:n, joiden seurauksena vapautuu lukuisia akuutin vaiheen sytokiineja kuten IL-1, IL-6 ja TNF sekä interferoneja, kemokiineja ja vasoaktivaattoreita. Paikallisesti tämä saa aikaan tulehdusvasteen ja tukee synnynnäisen immuunijärjestelmän mekanismeja, kuten fagosytoosia sekä antimikrobiaalisten aineiden vapauttamista. Systeemisesti syntyy akuutin faasin reaktio. (13),(22)

Akuutin faasin reaktiossa vapautuvat sytokiinit, esimerkiksi IL-1, IL-6 ja TNF saavat aikaan joukon muutoksia eri kohdesoluissa- ja elimissä. HPA-akseli (hypothalamic-pituitary-adrenal axis) aktivoituu, kasvuhormonin erityys vähenee ja syntyy fysiologisia vasteita, kuten kuume, ruokahalun väheneminen ja lihassolujen katabolinen tila. Akuutin faasin reaktio aiheuttaa muutoksia useiden niin sanottujen akuutin faasin proteiinien (APP, acute phase protein) pitoisuuksissa plasmassa. Pitoisuus voi olla akuutin faasin seurauksena kohonnut (positiivinen APP) tai madaltunut (negatiivinen APP). Maksassa akuutin faasin reaktio saa aikaan merkittäviä muutoksia proteiinisynteesissä. Positiivisten APP:ien, synteesin lisääntymisen vuoksi muu proteiinituotanto vähenee, jonka vuoksi voidaan erotella myös negatiivisia APP:ita. Positiivisia APP:ita ovat esimerkiksi CRP (C-reaktiivinen proteiini), SAA (seerumin amyloidi A) ja haptoglobiini. Negatiivisia APP:ita ovat muun muassa prealbumiini, transferriini ja albumiini. (23)

Hankinnaisen immuunijärjestelmän vaste alkaa kunnolla kehittyä, mikäli mikrobi selviää edellä kuvatusta ensi vaiheen tulehdusvasteesta. Antigeneja esittelevät solut, kudosmakrofagit, vaeltavat imusolmukkeisiin, joissa ne esittelevät antigeeniä yhdessä MHC-kompleksin (major histocompatibility-kompleksi) kanssa imusolmukkeessa oleville CD4 T-soluille. Antigeenin tunnistavat CD4-solut aktivoituvat auttaja T-soluiksi, jotka auttavat CD8 T-soluja sekä B-soluja tuhoamaan patogeenin. Hankinnaisen immuunijärjestelmän vaste on ensimmäistä kertaa patogeenia kohdattaessa hidas, sillä antigeenin spesifisti tunnistavia CD4-soluja ei ole ja tällöin tarvitaan aikaa vievä kypsymisprosessi, jonka myötä kehittyy tarkemmin antigeenin tunnistavia soluja. Antigeneja esittelevä solu voi vapauttaa eri sytokiineja riippuen siitä minkälaisia PAMP- ja DAMP – molekyylejä se on kohdannut. Tämä vaikuttaa B-solujen tuottamien vasta-aineiden luokkaan. Tulehdusvasteen ohituttua suuri osa antigeenille spesifeistä B- ja T – soluista kuolee, mutta osa jää elimistöön muistisoluiksi, jolloin jatkossa hankinnaisen immuunijärjestelmän reaktio voi olla nopeampi. (21)

2.3 Uneen vaikuttavat sytokiinit

Ensimmäisen näyttö uneliasuutta keskushermostotasolla aiheuttavista aineista on 1900-luvun alusta, jolloin Japanissa osoitettiin että hyvin nukkuneilla koirilla uni saatiin indusoitua injektoimalla niihin likvoria, joka oli otettu univajeessa pidetyiltä koirilta (24). Sama havainto tehtiin riippumattomasti samoihin aikoihin Ranskassa (25). Likvorin katsottiin siis sisältävän unta aiheuttavia aineita. Myöhemmin osoittautui, että nämä aineet ovat samoja, jotka ovat keskeisiä tulehdusvasteen synnyssä. (26)

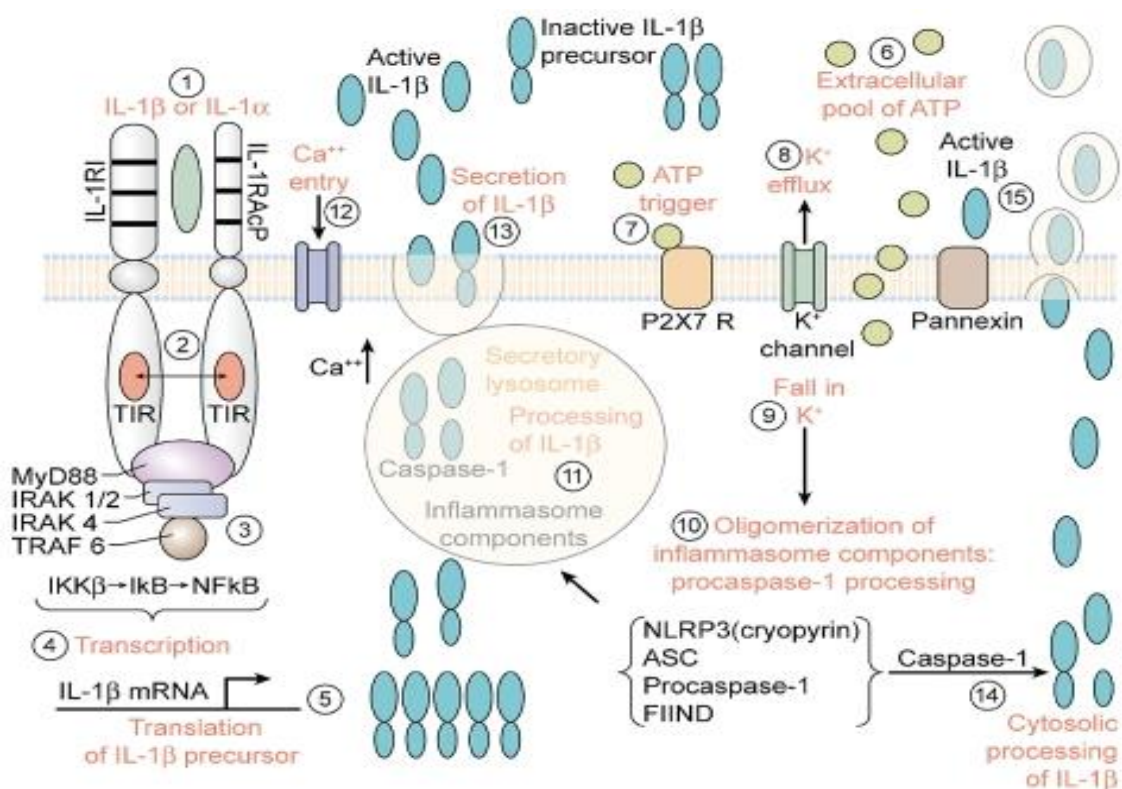
Jotta jotakin molekyyliä voidaan kutsua unta sääteleväksi (SRS, sleep regulating substance), täytyy tiettyjen kriteerien täytyä. Aineen antamisen tulee lisätä unen määrää ja toisaalta aineen vaikutuksen biologisen poiston tai aineen tuotannon estämisen tulee vähentää spontaania unta. Lisäksi näiden aineiden vuorokaudenajasta riippuvaisen endogeenisen tuotannon tulee heijastua uni-valve käyttäytymiseen, eli niiden pitoisuudet korreloivat uneliaisuuden kanssa. Merkittävimmät uneen vaikuttavat sytokiinit ovat IL-1 β ja TNF. Myös muilla sytokiineilla, kuten IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL15 ja IL-18 on osoitettu olevan roolinsa unen säätelyssä. Pääsääntöisesti anti-inflammatorisilla sytokiineilla on todettu esimerkiksi NREM- unta vähentävä vaikutus, kun taas proinflammatorisilla sytokiineilla on sitä lisäävä vaikutus. (26),(27)

2.3.1 IL-1 β

IL-1 perhe on 11 sytokiinin ryhmä. Ne aktivoivat lukuisten proinflammatoristen sytokiininien verkostoa sekä säätelevät ja aikaansaavat tulehduksellisia prosesseja integriinien ilmenemisen kautta leukosyyttien ja endoteelisolujen pinnalla. Tutkituimmat IL-1 perheen sytokiinit ovat IL-1 α ja IL-1 β . Niiden antagonistina toimii IL-1Ra, joka sitoutuu samaan reseptoriin (IL-1R). IL-1 eritetään pääosin kudismakrofageissa, monosyyteissä, fibroblasteissa sekä dendriittisoluissa, mutta myös B lymfosyyteissä, NK-soluissa, mikrogliasoluissa ja epiteelisoluissa. Sytokiininien vaikutuksesta endoteelisolujen adheesiotekijöiden geeniekspressio lisääntyy helpottaen immuunijärjestelmän solujen pääsyä infektiolueelle. Niillä on myös suora vaikutus hypotalamuksen lämmönsäätelyalueeseen, joten niillä on rooli myös kuumeen nostamisessa. Näiden vaikutusten lisäksi IL-1 aiheuttaa kipuherkkyyden alentumista, verisuonien laajenemista sekä matalaa verenpainetta. IL-1 α vapautuu solutuhon yhteydessä ja toimii DAMP-molekyylinä. Se ei ole kuitenkaan spesifi infektiolle, sillä solutuhoa voi syntyä monella muullakin mekanismilla, esimerkiksi iskemian johdosta.

IL-1 β syntetisoidaan vain stimulaation perusteella. Sen ilmenemistä indusoi transkriptiotekijä NF- κ B mukautuvan immuunijärjestelmän solun kohdatessa esimerkiksi lipopolysakkarideja, jotka sitoutuvat TLR-4 – reseptoriin (Toll-like receptor 4) ja toimivat PAMP-molekyyleinä. IL-1 β syntetisoidaan prekursorimolekyylinä ja vaatii pilkkoutumista kaspasi-1 – molekyylin toimesta ennen kuin se voi sitoutua IL-1 – reseptoriin. Kaspasi-1 puolestaan tarvitsee aktivaatioonsa inflammasomi-kompleksin, joka muodostuu myös reaktiona hahmontunnistusreseptorisignaaloinnin aktivoitumiselle, kuten myöhemmin kappaleessa 2.5 kuvataan

IL-1 α tai IL-1 β sitoutuminen reseptorin ligandinsitomisketjuun IL-1RI (IL-1R type I) saa aikaan koreseptoriketju IL-1RAcP:n (IL-1R accessory protein) rekrytoitumisen muodostamaan heterodimeerin yhdessä IL-1RI kanssa. Signaali etenee solun sisälle, kun adaptorimolekyylä MyD88 rekrytoituu kompleksin solunsisäiseen TIR-osaan (Toll-IL-1 receptor). Tämä saa aikaan lukuisten kinaasien fosforylaatioiden seurauksena transkriptiotekijä NF- κ B:n (nuklear factor kappa B) siirtymiseen tumaan sekä muun muassa JNK- ja p38 MAPK reittien aktivoitumisen. Näiden yhteisvaikutuksena IL-1:n kohdegeenit ekspressoituvat. Kohdegeenejä ovat muun muassa IL-6, IL-8, MC-1, COX-2, I κ B α , IL-1 α , IL-1 β sekä MPK-1. IL-1 aiheuttaa näin ollen myös signaalia vahvistavan vaikutuksen, sillä sen oma synteesi on yksi kohdevaikutuksista (kuva 3). (28)



Kuva 3 (28). IL-1 aiheuttaman IL-1 vapautuksen vaiheet. 1) Veren monosyytin, kudosmakrofagin tai dendriittisolun aktivoituminen IL-1 β tai IL-1 α prekursorin toimesta muodostaen IL-1 reseptorikompleksin heterodimeerin IL-1RI:n ja IL-1RAcP kesken. 2) Solunsisäisten domeenien lähentyminen. 3) MyD88 rekrytoituu ja fosforyloi IL-1R:iin liittyvät kinaasit (IRAK, IL-1 associated kinase) ja NF κ B kinaasi β :aa inhiboivan tekijän (IKK β , inhibitor of NF κ B kinase β). 4) IL-1 β transkriptio. 5) Translaatio IL-1 β mRNA:ksi tapahtuu polysomeissa. 6) Monosyyteistä/makrofageista vapautuva ATP kumuloituu solunulkoisessa tilassa. 7) ATP aktivoi P2X7 reseptorin. 8) ATP:n sitouduttua P2X7-reseptoriin, seuraa kaliumin ulosvirtaus solusta. 9) Solunsisäisen kaliumkonsentraation lasku. 10) Solunsisäisen kaliumkonsentraation lasku toimii triggerinä inflammasomin komponenttien kokoamiselle ja tämän seurauksena prokaspasi-1 muuttuu aktiiviseksi kaspasi-1:ksi. 11) Kaspasi-1 on samoissa sekreetorisissa lysosomeissa kuin IL-1 β prekursori ja lysosomaaliset entsyymit. Aktiivinen kaspasi-1 pilkkoo IL-1 β prekursorin paljastaen aktiivisen, kypsän IL-1 β karboksyyliterminaalin. 12) Kalsiumin virtaus soluun ja solunsisäisen kalsiumkonsentraation nousu, joka aktivoi fosfatidyylikoliinispesifisen fosfolipaasi C:n (phosphatidylcholine-specific phospholipase C) ja kalsiumriippuvaisen fosfolipaasi A:n. 13) Kypsän IL-1 β :n, IL-1 β prekursorin sekä muun sekreetorisen lysosomin sisällön vapauttaminen solun ulkopuolelle eksosytoosin kautta. 14) IL-1 β prekursorin prosessointi solulimassa. Rab39a edesauttaa IL-1 β vapauttamista ohjaamalla IL-1 β :n vesikkeleihin. 15) Kypsä IL-1 β poistuu solusta joko solukalvon hajoamisen seurauksena tai mikrovesikkeleissä.

2.3.2 TNF

TNF tai aiemmalta nimeltään TNF α (tumor necrosis factor alpha) on signaaliproteiini, joka on yksi akuutin faasin reaktiota aiheuttavista sytokiineistä. Sillä on huomattava rooli muun muassa aivojen kehityksessä, neuroprotektiossa, aivojen verenkierron ja immuunivasteessa. Yksi sen tehtävistä on kuumeen nostaminen. TNF erittyy pääasiassa makrofageista, mutta sitä erittävät myös monet muut immuunijärjestelmän solut sekä neuronit. TNF:n dysregulaatio on yhteydessä Alzheimerin tautiin (29), syöpään (30), masennukseen (31), psoriasikseen (32) ja IBD-sairauksiin (33). Molekyylin löytövaiheessa huomattiin sen kyky tuhota syöpäsoluja, josta se on saanut nimensä.

TNF on rakenteeltaan 233 aminohappoa pitkä tyypin II transmembraaninen proteiini, joka järjestäytyy homotrimeereiksi. Liukoisen muodon (sTNF) vapautus tapahtuu metalloproteinaasi TACE:n (TNF alpha converting enzyme) vaikutuksesta. Trimeeri dissosioituu nanomolaarisissa konsentraatioissa liukoiksi monomeereiksi. Sekä solukalvoon sitoutunut, että eritetty TNF α ovat biologisesti aktiivisia.

TNF voi sitoutua kahteen eri reseptoriin, jotka ovat TNFR1 (TNF receptor type 1) ja TNFR2 (TNF receptor type 2). TNFR1 ilmentyy useimmissa kudoksissa, kun taas TNFR2 pääasiassa immuunijärjestelmän soluissa. Reseptoriin sitoutuminen aiheuttaa reseptorin trimerisaation, joka saa aikaan reseptorin konformaation muutoksen. Tämä johtaa inhiboivan proteiini SODD:in irtautumiseen reseptorin niin kutsutusta "death domainista". Tämä irtautuminen mahdollistaa adaptoriproteiini TRADD:n sitoutumisen death domainiin ja toimimisen alustana seuraavan proteiinin sitoutumiselle.

TRADD:in sitoutumisen jälkeen kolme vaihtoehtoista signalointiketjua voi aktivoitua. NF- κ B-reitin aktivaatio johtaa monimutkaisen signaalireitin kautta NF- κ B-molekyylin vapautumiseen, jolloin se voi toimia solutumassa transkriptiotekijänä ja aloittaa monien solun selviytymiseen ja proliferaatioon sekä immuunijärjestelmän toimintaan vaikuttavien proteiinien sekä anti-apoptoottisten tekijöiden transkription. MAPK-reitti puolestaan vapauttaa JNK:n, joka aktivoi transkriptiotekijöitä, joiden kohteet vaikuttavat solujen erilaistumiseen ja proliferaatioon. Tämä reitti on yleensä proapoptoottinen eli solukuolemaa edistävä. Kolmas reitti on solukuoleman signalointireitti. TNFR1 on osallisena tässä signaloinnissa, mutta se on vain pienessä osassa verrattuna TNF-signaloinnin tulehdukseen vaikuttaviin vaikutuksiin. Tämän reitin solukuoleman aiheuttamiskyky on heikko verrattuna useisiin muihin solukuolemasignaaleihin ja usein peittyy NF- κ B:n vahvempiin anti-apotoottisiin signaaleihin. Reitin solukuolemaa aiheuttava kyky perustuu FADD:in (FAS-associated protein with death domain) sitoutumiseen TRADD:iin, jolloin FADD rekrytoi caspaasi-8:n, joka suurissa konsentraatioissa johtaa väistämättömään solukuolemaan. (34)

TNF vaikutukset soluun riippuvat muun muassa kohdesolun tyypistä, muiden sytokiinien samanaikaisesta stimulaatiosta ja solunsisäisten happiradikaalien määrästä. Monimutkaiset signaalireitit ovat varmistamassa sitä, että TNF-signalointi saa aikaan yhdessä muiden sytokiinien kanssa kullekin kohteelle asianmukaisen vasteen tulehdukseen. Hypotalamuksessa ja maksassa signalointi aiheuttaa akuutin faasin vasteen, jota on lyhyesti kuvattu kappaleessa 2.2.3. Maksassa sekä rasva- ja lihassoluissa TNF muuttaa glukoosimetaboliaa. Rasvasoluissa sen on osoitettu aiheuttavan insuliinireseptorisubstraatti 1:n (IRS-1) fosforylaation, mikä estää insuliinisignalointia ja vähentää insuliinin vaikutusta kohdesoluun johtaen insuliiniresistenssiin ja sen myötä diabeteksen puhkeamiseen. (35)

2.4 Toll-like reseptorit

Toll-like reseptorit (TLR) on tärkeä ryhmä luontaisen immuunijärjestelmän hahmontunnistusreseptoreita (PRR, pattern recognizing receptor). Niitä on ihmisellä kymmenen erilaista ja niitä esiintyy elimistön kaikissa kudoksissa, mutta erityisen tärkeitä ne ovat luontaisen immuunijärjestelmän solujen pinnalla. Tyypillisesti TLR:it ovat tyypin I kalvogleykoproteiineja, jotka ulottuvat solukalvon molemmille puolille. Solun sisällä on reseptorin TIR-alue (Toll/Interleukin-1 receptor domain) ja se on olennainen solunsisäisten signaalireittien aktivoitumiselle. Ligandin sitoutuessa reseptoriin solukalvon ulkopuolisessa osassa, aktivoituu signaalireitti, joka riippuu kyseessä olevasta TLR:stä sekä TIR-alueeseen sitoutuvasta adaptorimolekyylistä. Lopputuloksena solu alkaa tuottaa sytokiineja, jotka käynnistävät tulehdusreaktion, säätelevät puolustusjärjestelmän muiden solujen vasteita ja voivat myös saada aikaan hankitun immuunipuolustuksen aktivoitumisen. Eri TLR:ien samanaikaisella aktivaatiolla voi olla myös synergisiä vaikutuksia solunsisäisten signaaliketjujen aktivoitumiseksi. Proinflammatorisen signaloinnin lisäksi TLR aktivaatio voi johtaa myös pro-apoptoottisten signaalimolekyylien tuottamiseen.

TLR:ien säätely on tärkeää, jotta niiden liiallinen aktivaatio ei ole haitaksi elimistölle. Säätelymekanismeja ovat mm liukoiset TLR:t, jotka kilpailevat ligandeista. Myös solukalvossa on tekijöitä, jotka estävät ligandien kiinnittymistä reseptoriin. Signaaliketjua säädellään myös solunsisäisesti. Hiirikokeilla on osoitettu, että tietyn säätelyreitin puute johtaa letaaliin inflammatioon (36).

Toll-like reseptori 4 aktivoi inflammatorisen signaloinnin kaskadia kohdatessaan endogeenisiä ligandeja, esimerkiksi heat shock proteiineja, joiden tiedetään olevan koholla univajeessa (18). Kuten edellä kappaleessa 2.3.1 on kuvattu, voi ligandin sitoutuminen TLR4 tyypin reseptoriin johtaa IL-1 β :n transkription alkamiseen ja sen erittymiseen solusta. Näin ollen TLR4 on mahdollinen mediaattori univajeen vaikutuksille immuunijärjestelmän toiminnassa.

2.5 NLRP3 ja inflammasomi

Solukalvon lävistävien hahmontunnistusreseptorien lisäksi myös sytosolissa, eli solulimassa, on erilaisten hahmontunnistusreseptorien ryhmiä. Yksi näistä ryhmistä on NLR-tyyppiset reseptorit (NOD-like receptors), jonka keskeiset komponentit ovat NOD-domeeni (nucleotide-binding oligomerization domain, toiselta nimeltä NACHT), LRR-domeeni (leusine rich repeat) sekä NOD/NACHT:n N-terminaalinen domeeni. Yksi vaihtoehto N-terminaaliseksi domeeniksi on pyriinidomeeni PYD (pyrin domain) ja sen omaavia alaryhmiä ovat esimerkiksi NLRP:t (NOD-like receptors containing a pyrin domain), joita ihmisellä on 14 erilaista. NLRP-ryhmän reseptoreissa NOD/NACHT domeenin C-terminaaliset LRR:t toimivat ligandintunnistuksessa, kun taas sen N-terminaalinen PYD välittää signaaleja eteenpäin. PYD onkin keskeinen tekijä luontaisen immuunivasteen signaalinvälityksessä johtaen useiden olennaisten immuunivastetta edistävien signalointireittien aktivaatioon eri adaptorimolekyylien rekrytoinnin kautta. Toisaalta näiden pyriinidomeenin sisältävien hahmontunnistusreseptorien geneeissä olevien mutaatioiden on myös todettu olevan yhteydessä autoinflamatoristen- ja autoimmuunisairauksien kehittymiseen. Pyriinidomeenin sisältävien reseptoreiden parhaiten tunnettu toiminto on kyky koota inflammasomeja, jotka ovat lukuisten proteiinien muodostamia oligomeerejä. NLRP inflammasomiin kuuluu itse reseptorin lisäksi adaptoriproteiini ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD-domain) sekä prokaspasi-1, joka on proteaasi. Inflammasomin kokoaminen johtaa autokatalyyysin kautta inflammatorisen kaspasi-1:n aktivaatioon. Kaspasi-1:n aktivaation seuraukset riippuvat tällöin inflammasomin tyypistä. NLRP-tyypin reseptoreista inflammasomin muodostukseen kykenevät ainakin NLRP1 ja NLRP3. (37)

NLRP3 on ryhmänsä tutkituin reseptori ja inflammasomi. Sitä ilmennetään lähinnä luontaisen immuunijärjestelmän soluissa, erityisesti makrofageissa. Näiden solujen solulimassa sitä on inaktiivina ubikinoituna muotona, joka on kykenemätön oligomerisaatioon. Muihin NLR:iin verrattuna NLRP3:n aktivaation voi saada aikaan suurempi joukko erilaisia stimuluksia. Aktivaatioon voi johtaa stimulut, jotka ovat peräisin PAMP:eista, mutta myös erilaisista DAMP:eista, jotka ovat peräisin steriileistä (ei mikrobiperäisistä) ympäristöstä tulevista tai endogeenisistä stressisignaaleista. Ympäristöstä peräisin olevia triggereitä ovat esimerkiksi aluna (alkalimetallien kaksoissulfaatti), asbesti, piidioksidi ja jopa UVB-säteily. Endogeenisiä vaarasignaaleja ovat muun muassa uraattikiteet, kalsiumpyrofosfaattikiteet, kolesterolikiteet, amyloidikertymät, hydroksiapatiitti ja hyaluroni. Lisäksi NLRP3 reagoi myös ATP:hen (adenosiinitrifosfaatti), korkeaan sokeripitoisuuteen ja saturoituneisiin rasvahappoihin. (37) NLRP3-agonistien laajan kirjon vuoksi reseptorin aktivaatio tapahtuu todennäköisesti välillisten tekijöiden kautta sen sijaan, että aktivaatio vaatisi suoran reseptori-ligandi – vuorovaikutuksen.

NLRP3:n aktivoituminen vaatii kaksi yhtäkaista signaalia. Ensinnäkin NLRP3 ilmeneminen vaatii NF- κ B:n aktivoitumisen, joka voi tapahtua esimerkiksi proinflammatoristen sytokiinien tai TLR4:stä lähtöisin olevien signaalireittien kautta. Tämän pohjustavan signaalin on todettu myös potentoivan kaspasi-1:n NLRP3-spesifistä aktivaatiota jo ennen kuin NLRP3 ilmeneminen on ehtinyt lisääntyä. Tämän taustalla arvellaan olevan TLR4-MyD88 – riippuvainen inaktiivin NLRP3:n deubikinaatio BRCC3-metalloproteiinaasin toimesta. Pohjustava signaalin lisäksi NLRP3 aktivaatioon ja inflammasomin muodostukseen vaaditaan vielä aktivoiva signaali. Yksi ehdotus aktivoivaksi signaaliksi on kalium-ionin ulosvirtaus solusta. Sen voi saada aikaan muun muassa bakteerien tuottamat hemolysiinit, mutta myös kudosaauriosta ja solukuolemasta peräisin oleva solunulkoisen ATP:n nousu. (37),(38) Yksi NLRP3 Inflammasomin muodostumisen seurauksista on kaspasi-1 kaskadin aktivoituminen prokaspasi-1 toimesta, mikä taas johtaa IL-1 β prekursoriproteiinin pilkkoutumiseen ja aktiivisen IL-1 β vapautumiseen solusta, kuten kappaleessa 2.3.1 on esitetty (kuva 3).

Koska NLRP3 voi aktivoitua myös steriilien stressisignaalien seurauksena, on sen pohdittu olevan yksi mahdollisista univajeen immuunijärjestelmän aktivoitumista laukaisevista tekijöistä. Moni asia NLRP3 inflammasomin toiminnassa ligandin sitoutumisesta lähtien on tällä hetkellä epäselvää ja vaatii jatkotutkimuksia. Ottaen huomioon univajeen kiistattomat vaikutukset muun muassa sydän- ja verisuonisairauksien sairastavuuteen, olisi varmasti hyödyllistä tutkia pystytäänkö immuunijärjestelmän aktivaatio univajeessa yhdistämään NLRP3:een.

2.6 Univajeen vaikutukset immuunijärjestelmän komponentteihin

2.6.1. Tutkimuksissa havaittuja muutoksia

Aiemmissa tutkimuksissa on jo osoitettu muun muassa IL-1 β :n ja TNF:n pitoisuuden veressä nousevan merkitsevästi jo yhden yön totaalisen univajeen seurauksena (39). Ryhmän aiemmassa tutkimuksessa osoitettiin myös geeniekspressiotasolla TNF koodaavien geenien ekspression lisääntyminen useamman päivän osittaisen univajeen jälkeen (15). Muutokset ovat palautuvia, eli unen määrän lisääminen normaalille tasolle korjaa muutokset. Pitkäkestoisessa univajeessa PBMC-solujen geeniekspressiossa on osoitettu tapahtuvan muutoksia ja toisaalta pitkäkestoisen osittaisen univajeen on todettu aiheuttavan kroonista matala-asteista tulehdusta. Koska muiden sytokiinien ohella TNF:n tiedetään vaikuttavan akuutin faasin reaktion syntyyn ja näin ollen CRP:n synteysiin, on tämä yksi selittävä tekijä näille univajeessa todettaville muutoksille. (13),(22)

Unen keston on osoitettu olevan yhteydessä moniin sairauksiin, mutta myös kuolleisuuteen. Asiasta tehdyn meta-analyysin mukaan <7 tunnin uni naisilla tai >8 tunnin uni sekä naisilla että miehillä on yhteydessä kohonneeseen kuolleisuuteen. (40). Pitkän unen vaikutus kuolleisuuteen johtunee randomoimattomista myötätekijöistä, kuten komorbiditeeteistä, jotka voivat pidentää uniaikaa elämän viimeisinä kuukausina. Liian lyhyen unen arvellaan kuitenkin aiheuttavan lisääntynyttä kuolleisuutta inflammatorisen säätelyn häiriintymisen seurauksena.

Lyhytaikaisen univajeen ei ole tähän asti todettu aiheuttavan muutoksia opitun immuunijärjestelmän komponentteihin. Tätä asiaa ei ole kuitenkaan kokeellisesti tutkittu geeniekspression tasolla. Pidemmällä ajalla koetun osittaisenkin univajeen on kuitenkin aiemmissa tutkimuksissa todettu vaikuttavan myös opitun immuunijärjestelmän komponentteihin geeniekspressiotasolla. (15)

2.6.2 Mekanismit immuunijärjestelmän muutosten taustalla.

Lyhytkestoinen päivien osittainen univaje aiheuttaa jo kohonneita inflammaatiomarkkerien pitoisuuksia. Näitä markkereita ovat esimerkiksi CRP, IL-6, TNF, sTNF-RII, IFN γ . Kohonnut CRP voi olla myös linkkinä sydän- ja verisuonitautien riskien kohoamiseen.

Hypoteesin mukaan tietyt hidasaltounesta, eli syvästä unesta, riippuvaiset toiminnot suojaavat aivoja inflammaatiolta. Tätä hypoteesia tukee tutkimus, jonka mukaan aivojen beta-amyloidin pitoisuus terveiden koehenkilöiden aivoselkäydinnesteessä noudattaa rytmiä, joka vastaa univalverytmiä. Beta-amyloidin määrä nousee päivällä ja laskee yöllä. Beta-amyloidi toimii aivoissa DAMP-molekyylinä aktivoiden immuunivastetta ja aiheuttaa näin ollen inflammatoristen sytokiinien erittymistä. Beta-amyloidin määrä aivoselkäydinnesteessä on myös tavanomaista korkeampi koko yön kestäneen unideprivaation tai syvän unen häiritsemisen jälkeen. Beta-amyloidin oletetaan huuhtoutuvan aivoista nimenomaan unen aikana aivojen glymfaattisen järjestelmän toimiessa aktiivisimmillaan. Myös IL-1:n ja TNF:n puhdistuman aivoista arvellaan tapahtuvan NREM-unen aikana. (41, 42) Koska sekä IL-1 että TNF voivat saada aikaan NF- κ B:n aktivoitumisen ja täten ovat kykeneviä tuottamaan NLRP3 inflammasomin aktivaation vaadittavan pohjustavan signaalin, voi beta-amyloidin proinflammatorinen vaikutus ja näiden molekyylien heikentynyt puhdistuma olla yksi mekanismeista, joilla univaje edesauttaa immuunijärjestelmän aktivoitumista.

Myös hypotalamus-aivolisäke-lisämunuaiskuori-akseli (HPA-akseli (hypotalamus-pituitary-adrenal cortex axis), joka toimii tärkeänä inflammatoristen prosessien hillitsijänä saattaa myös toimia huonommin univajeessa (43). Eräs tutkimus osoitti, että univajeen jälkeen inflammatoristen – ja stressimarkkereiden vuorovaikutus solutasolla oli poikkeavaa pitkittyneen univajeen jälkeen, mikä osoitettiin in vitro monosyyttien herkistymisellä anti-inflammatoriseen kortisoli-signaalointiin. (44). Tämä selittää ainakin osittain univajeen aiheuttamia vaikutuksia immuunijärjestelmän toimintaan koko kehossa.

3 Tutkimuksen tavoitteet

Univaje aiheuttaa immuunipuolustuksen aktivaation, sytokiinitasojen nousua ja rasva-aineenvaihdunnan muutoksia. Tutkielmassa kuvatus tutkimuksen tavoite on selvittää millaisia muutoksia lyhytkestoinen totaalinen univaje aiheuttaa immuunipuolustuksessa toimijoiden geeniekspressiossa sekä pyrkiä selvittämään niiden taustalla vallitsevia mekanismeja.

Aiemmin tehdyssä tutkimuksessa osoitettiin geeniekspression muuttuvan viiden vuorokauden osittaisen univajeen aikana. Tässä tutkimuksessa pyritään osoittamaan näkyykö näitä muutoksia jo yhden yön totaalisen univajeen seurauksena.

4 Menetelmät ja aineisto

4.1 Koehenkilöt

Tutkimukseen osallistui 18 tervettä 19-29 -vuotiasta miestä. Koehenkilöt olivat normaalipainoisia ja heillä ei ollut pitkäaikaissairauksia eikä säännöllistä lääkitystä. Koehenkilöillä tuli olla säännöllinen unirytmä ja he subjektiivisesti kokivat nukkuvansa hyvin. Epänormaalia väsymystä ei saanut esiintyä ennen tutkimukseen hakeutumista. Koeasetelmassa koehenkilöiden verrokkeina toimivat koehenkilöt itse. Säännöllinen ja oikea-aikainen unirytmä varmistettiin seuraamalla koehenkilöiden nukkumista nukkumispäiväkirjojen ja aktigrafien avulla vähintään kahden viikon ajan. Koehenkilöiltä edellytettiin myös tupakoimattomuutta ja vähintään viiden vuorokauden raittiutta ennen koetta. Koehenkilöitä pyydettiin myös noudattamaan ravitsemussuositusten mukaista ruokavaliota ja piristävien aineiden, kuten kofeiinin välttämistä viiden vuorokauden ajalla ennen kokeen aloittamista.

4.2 Koeasetelma

Tutkimus toteutettiin kokeellisena tutkimuksena, jossa koehenkilöt altistettiin totaaliselle univajeelle. Koejakso kesti kunkin koehenkilön kohdalla 48 tuntia ja se järjestettiin Biomedicum Helsinki 1 tiloissa. Tutkittavat tulivat tutkimukseen pareittain. Koejakso alkoi tutkittavien saapumisella ensimmäisen päivän illalla klo 19.30, jolloin otettiin myös ensimmäiset verikokeet. Tutkittavat nukkuivat klo 22.30-7.30 välisenä aikana henkilökohtaisessa täysin pimennetyssä tilassa ja nukutun yön jälkeen kerättiin kontrollinäytteet tutkittavien herättyä klo 7.30 jälkeen. Nukutun yön jälkeen tutkittavat valvoivat yhtäjaksoisesti 36 tuntia valvonnan alaisina. Samoissa tiloissa oli koko tutkimuksen ajan läsnä kokeen valvoja.

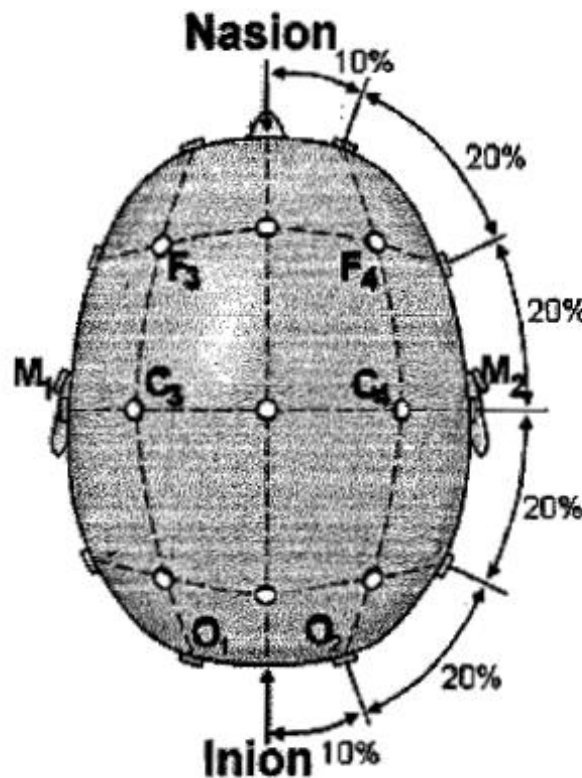
Kriittisen ajan, eli klo 22-19.30 tutkittavat olivat enintään noin 5 min mittaisia vessataukoja lukuun ottamatta jatkuvasti valvojan silmän alla, jotta pystyttiin varmistamaan, että tutkittavat eivät nukahda. Tutkittavilla oli hereillä olon edistämiseksi mahdollisuus muun muassa pelata lautapelejä, katsoa televisiosta elokuvia ja pelata videopelejä. Valvomisen aikana käytössä oli normaali sisävalaistus. Tutkimustiloihin, lukuun ottamatta nukkumiseen tarkoitettua tilaa, pääsi myös luonnonvaloa. Kaikki koeajanjaksot suoritettiin kesä-elokuussa. Koehenkilöt saivat suomalaisten ravintosuositusten mukaista ruokaa, jonka toimitti Meilahden sairaalan keittiö. Aamupala syötiin klo 8.00 aamun verinäytteiden jälkeen, lounas klo 12.00, välipala klo 15.00 ja päivällinen klo 20.00 illan verinäytteiden jälkeen. Lisäksi valvotun yön aikana koehenkilöt saivat yhden omenan klo 03.00. Tutkittavilla oli mahdollisuus käydä suihkussa nukutun yön jälkeen aamulla klo 9-11 välisenä aikana.

Tällä koeasetelmalla tutkimukselle haettiin ja myönnettiin tutkimuslupa Helsingin ja Uudenmaan sairaanhoitopiirin eettiseltä toimikunnalta.

4.3 Unen ja valveen mittaaminen

Koehenkilöiden unta seurattiin jatkuvalla EEG-seurannalla kannettavalla laitteella koko laboratoriossa vietetyn ajan. Laitteet asennettiin tulopäivän illalla ennen nukkumaanmenoa. Jatkuva seuranta keskeytettiin vain akkujen vaihdon ja mahdollisen suihkussa käynnin ajaksi. Seurannalla varmistettiin tutkittavien unen määrä ja laatu ensimmäisen yön aikana. Valvotun yön ajan tutkittavat olivat lyhyitä vessataukoja lukuun ottamatta jatkuvasti valvovan silmän alla, mutta EEG-seurannalla pystytään myös jälkikäteen osoittamaan heidän olleen hereillä valvottavana aikana.

EEG-mittauksissa käytettiin kuusikanavaista mittausta kansainvälisen 10-20 -järjestelmän mukaisesti. Irtoelektrodit asetettiin paikoille F3, F4, C3, C4, O1 ja O2. Referenssielektrodit olivat sijainneissa M1 ja M2 (kuva 4). Silmänliikkeitä mitattiin EOG-mittauksella ja lihasjännityttä EMG-mittauksella, jossa elektrodi sijoitettiin leuan alle digastricus-lihasten päälle. EOG-elektrodit asetettiin n. 1 cm oikean silmäkulman yläpuolelle ja n. 1 cm vasemman silmän alapuolelle ja referenssielektrodi otsaan. EMG-elektrodin sijainti oli leuan alapuolelle 2 cm leuan kärjestä posteriorisesti ja siitä 2 cm lateraalisesti molemmille puolille ja sen referenssielektrodi asetettiin leuan päälle.



Kuva 4 (20). Elektrodien sijoituspaikat 10-20 –järjestelmän mukaisesti. Prosenttiosuudet kuvaavat osuutta nasionin (nenän tyvi) ja inionin (kallon takaosassa oleva pieni ulkonema) välisestä ihon pintaa pitkin mitatusta etäisyydestä ja osoittavat pisteet, joiden perusteella tarkka elektrodin asetuspaikka määräytyy.

EEG:tä asennettaessa elektrodiparien impedanssit säädettiin alle 10 k Ω arvoihin ennen laitteen käynnistystä. Mittalaitteena käytettiin Embla:a (Medcare Flaga hf, Islanti). Mittausten näytteenottotaajuus oli 200 Hz.

EEG-datan visualisointiin käytettiin Somnologica-ohjelmistoa (Embla systems inc, Kanada). Data analysoitiin manuaalisesti 30s pituisissa jaksoissa. Univaiheet jaettiin valvetilaan, N1-N3 -vaiheisiin ja REM-uneen. Univaiheiden määrittämisessä käytettiin AASM:n kriteereitä eri univaiheille. (20)

EEG-mittauksista saatiin kustakin koehenkilöstä hypnogrammi ja tämän perusteella arvioitiin tutkittavien unen laatua. Tutkittavat jaettiin kontrolloitynä hyvin nukkuneisiin ja huonosti nukkuneisiin, jotta tarvittaessa pystytään arviomaan, onko tutkittava ollut lievässä univajeessa jo tutkimuksen aikana omissa verrokkiarvoissaan. Unen laatua arvioitiin määrittämällä keskimääräinen unen määrä heräämisten välillä, sillä tämä korreloi tutkittavien subjektiivisten kokemusten kanssa. Kokonaisuniaika ensimmäisen nukahtamisen ja lopullisen heräämisen välillä jaettiin siis todettujen heräämisten määrällä. Raja-arvona käytettiin 20 minuuttia. Jos siis tutkittava nukkui vähintään 20 minuuttia keskimäärin heräämisten välillä, tulkittiin hänen nukkuneen hyvin.

4.4 Verinäytteet

Koehenkilöiltä otettiin verinäytteet kyynärtaipeen laskimoverestä neljästi tutkimuksen aikana. Näytteenottoajankohdat olivat klo 7.30 nukutun yön jälkeen, klo 19.30 samana päivänä, klo 7.30 valvotun yön jälkeen ja klo 19.30 samana päivänä.

4.4.1 PBMC-solujen eristys

Koehenkilöiden verikokeista eristettiin PBMC-soluja käyttäen FICOLL™ Hypaque™ -menetelmää. Eristys suoritettiin Biomedicum Helsinki 1 tiloissa. Verinäytteet kerättiin suoraan BD Vacutainer –koeputkiin (BS, USA). Putkissa on hepariinia veren hyytymisen estämiseksi, puskuriliuos veren laimentamiseksi ja polyesterigeeliä sekä FICOLL™ Hypaque™ -liuosta solujen erottamiseen. Näyteputki sentrifugoitiin kiihtyvyydellä 1900 g 20 minuutin ajan. Menetelmää käytettäessä putkeen muodostuu sentrifugoitaessa FICOLL-polysakkaridin muodostama kerros, joka eristää PBMC-solut muusta verestä. Näin solut voidaan pipetoida erilleen muusta verestä.

4.5 Oma osuus tutkimuksen teossa

Tämän kirjallisen työn lisäksi osallistuin tutkimuksen suunnitteluvaiheeseen, kokeen järjestämiseen käytännössä ja EEG-datan analysointiin. Kokeen käytännön järjestelyt varmistimme 4 hengen joukolla vuoroissa. Käytännön järjestelyitä olivat unen mittaamiseen tarkoitetun laitteiston asentaminen ja akunvaihdon yhteydessä suoritettu tarkastaminen, nukkumaanmenon ja heräämisen varmistaminen, ruokailun mahdollistaminen ja tutkittavien valvominen koko tutkimuksen ajan. EEG-datan analysointi suoritettiin kahden hengen voimin yöaikasen unen suhteen. Valveajan EEG tarkastettiin karkeasti käyttäen hyväksi käytetyn ohjelman automaattista analyysiä, sillä yhdenkään koehenkilön ei valvojien toimesta raportoitu nukkuneen valveillaoloon tarkoitettuna aikana.

5 Tulokset

Koska geeniekspression osalta tuloksia ei tutkielman kirjoittamishetkellä ole käytettävissä, kuvataan tässä kappaleessa mitä dataa tutkittavista kerättiin. Tulosten ollessa käyttämättömissä, datan liittamisestä tähän tutkielmaan ei ole kuitenkaan perusteltua hyötyä, joten se on jätetty pois.

5.1 Tutkimusta edeltävät viikot

5.1.1 Ruokailutottumukset

Tutkimusta edeltävien viikkojen aikana koehenkilöiltä kerättiin dataa ruokailutottumuksista ruokapäiväkirjojen avulla. Kaikkien koehenkilöiden katsottiin syöneen järkeviä määriä pääsääntöisesti terveelliseksi katsottavaa ruokaa.

5.1.2 Unirytm

Koehenkilöiden unirytmia seurattiin antamalla kaikille koehenkilöille käyttöön aktigrafi kahdeksi viikoksi ennen tutkimuksen suoritusta. Aktigrafien antaman datan perusteella pystytään päättämään millainen unirytm koehenkilöillä oli. Kaikki koehenkilöt noudattivat unirytmia, jossa pääasiallinen aika unelle oli yöllä klo 22-08 välisenä aikana.

5.2 EEG-mittaukset

EEG-mittausta tehtiin koko tutkimuksen ajan lukuunottamatta nukutun yön jälkeen suoritettua akkujen vaihtoa ja elektrodien impedanssien tarkastusta. Kaikkien tutkittavien EEG-mittaukset onnistuivat nukutun yön osalta ja sen perusteella tutkittavat pystyttiin jakamaan hyvin nukkuneisiin ja huonosti nukkuneisiin. Valveilla vietetyn ajan EEG toteutui myös kaikkien osalta ja siinä ei todettu kenenkään olleen unessa silloin kun olisi pitänyt valvoa. Tämä toki varmistettiin myös sillä, että tutkittavat olivat jatkuvasti tutkijan valvottavana valvotun yön ja seuraavan päivän aikana.

5.3 Tutkittavien vireystilan arviointi

Valvotun yön jälkeen tutkittavien vireystilaa arviotiin kerran tunnissa alkaen klo 20. Koehenkilöt arvioivat väsymystään asteikolla 1-10 ja suorittivat reaktioaikatestin tietokoneella.

5.4 Immuunijärjestelmän solujen geeniekspressio

Analyyseja ei ole tehty tämän tutkielman kirjoittamiseen mennessä.

6 Pohdinta

6.1 Tulokset

Tutkimuksesta ei ole tällä hetkellä saatu otsikkoaiheeseen liittyviä tuloksia.

Osan tutkittavista kaikkia näytteitä ei saatu kerättyä. Lisäksi suurta osaa näytteistä koskevan koeputkien laatuvirheen vuoksi kaikkien tutkittavien näytteet eivät välttämättä ole riittäviä kaikkiin haluttuihin analyyseihin. Lisäksi osa tutkittavista nukkui huonosti kontrolliyönä, mikä voi laskea merkittävien tuloksien saamisen todennäköisyyttä.

Näytteet ovat tallessa ja niistä mahdollisesti voidaan jatkossa tehdä analyysejä, mutta valitettavasti tämän tutkielman tekohetkeen mennessä analyysejä ei ole tehty.

6.2 Tulkinta ja virhelähteet

Tutkimus oli tekovaiheessaan ainutlaatuinen, sillä vastaavaa kokeellista ihmistutkimusta, joka tutkisi immuunijärjestelmän solujen geeniekspressiota, ei ollut toteutettu lyhytkestoisen totaalisen univajeen osalta. Koska tutkimus toteutettiin kokeellisena ihmistutkimuksena, on mahdolliset tulokset paremmin sovellettavissa kuin eläinkokeissa saadut tulokset. Tutkittavien pienen määrän vuoksi mahdolliset tulokset ovat kuitenkin parhaimmillaankin suuntaa antavia. Tutkimuksen tavoitteena oli saada selville, aiheuttaako lyhytaikainen univaje samankaltaisia muutoksia myös opitun immuunijärjestelmän solujen geeniekspressioon kuin pidempikestoisen univaje.

Kokeen tulosten soveltaminen käytännössä on kuitenkin rajallista. Koeasetelmaa vastaavaa koko yön valvomista harvoin toteutetaan normaalielämässä, sillä lähinnä kolmivuototyötä tekevillä voi toteutustavasta riippuen ilmetä jossain määrin vastaavanlaisia valvomisia. Vuorotyön tiedetään altistavan ihmisiä muun muassa liikalihavuudelle, diabetekselle ja sydän- ja verisuonisairauksille. Mikäli muutoksia geeniekspressioon olisi osoitettavissa, voitaisiin pohtia ovatko vuorotyön aiheuttamat terveydelle haitalliset vaikutukset osin seurausta vaikutuksista immuunijärjestelmän aktivaatioon. Suuri puute tutkimuksen soveltamisessa käytäntöön on se, että siinä ei tutkittu univajeen palautumisvaihetta, joten ei voida päätellä miten nopeasti mahdolliset muutokset palautuisivat normaalitasolle univajejakson jälkeen.

Lisäksi koeasetelman yhtenäistämiseksi tutkimuksessa käytettiin vain miehiä, sillä fertiili-ikäisillä naisilla kuukautiskierto aiheuttaa itsessään jatkuvasti muutoksia eri hormonien pitoisuuksiin ja on näin ollen huomattava sekoittava tekijä. Mikäli jatkossa haluttaisiin tutkia muutoksia myös naisilla, pitäisi siitä tehdä oma tutkimuksensa, jossa vakioitaisiin myös kuukautiskierron vaihe. (45).

Virhelähteeksi voidaan ajatella myös tutkittavien käyttöä omana verrokkinaan, sillä myös nämä verrokinäytteet on otettu tutkimuksen aikana. Vieraassa ympäristössä mittalaitteiden kanssa nukkuminen voi vaikuttaa unen laatuun, jolloin referenssinäytteet eivät välttämättä vastaa henkilön normaalia tilaa. Tähän voisi vaikuttaa pidentämällä tutkimusaikaa vuorokaudella, jolloin siihen voisi sisällyttää sopeutumisyön, kuten joissain kokeellisissa tutkimuksissa on tehty.

Myös ruokavalion mahdollisilla nopeilla muutoksilla voi olla vaikutusta tuloksiin, sillä vaikka tutkittavia kehoitettiin syömään suositusten mukaisesti, niin joka tapauksessa ravinnossa on mieltymysten vuoksi eroa aiempaan. Lisäksi sairaalakeittiöstä ei saatu kaikille koehenkilöille samaa ruokaa vaan se riippui päivän ruokalistasta. Tutkimuksen aikana pääasiassa ruokatottumustensa vuoksi kaikki tutkittavat eivät syöneet kaikkea annettua ruokaa ja tämäkin voi vaikuttaa tuloksiin. Ravitsemukseen liittyviä virhelähteitä voitaisiin minimoida yhtenäistämällä ruokalistaa ja kiinnittämällä huomioita ruoan maistuvuuteen.

6.3 Jatkossa

Riippumatta siitä saadaanko tämän tutkimusten tuloksista viitteitä yhteydestä univajeen ja immuunijärjestelmän toiminnan välillä, kannattaa asiaa tutkia tarkemmin. Tämän tutkimuksen voima on todennäköisesti liian pieni arvioimaan tulosta, joten vastaava tutkimus voi olla järkevää toistaa suuremmalla tutkittavien määrällä. Tulevissa kokeissa voi olla hyvä tutkia myös palautumisvaiheen muutoksia ja kestoja sekä ottaa huomioon sopeutuminen tutkimustiloihin ja laitteistoon. Tutkimus olisi järkevää toteuttaa jatkossa myös naisilla, sillä kuvatus tutkimuksen tuloksia ei voida täysin suoraan soveltaa naisiin.

Lähteet

- 1: Rechtschaffen A, Bergmann BM. Sleep deprivation in the rat by the disk-over-water method. *Behav Brain Res* 1995 Jul-Aug;69(1-2):55-63
- 2: Tononi G, Cirelli C. Sleep and the price of plasticity: from synaptic and cellular homeostasis to memory consolidation and integration. *Neuron*. 2014 Jan 8;81(1):12-34.
- 3: Mullington JM, Haack M, Toth M, Serrador JM, Meier-Ewert HK. Cardiovascular, inflammatory, and metabolic consequences of sleep deprivation. *Prog Cardiovasc Dis*. 2009 Jan-Feb;51(4):294-302.
- 4: Gottlieb DJ, Punjabi NM, Newman AB, Resnick HE, Redline S, Baldwin CM, Nieto FJ. Association of sleep time with diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Arch Intern Med*. 2005 Apr 25;165(8):863-7. doi: 10.1001/archinte.165.8.863. PMID: 15851636.
- 5: Cappuccio FP, Taggart FM, Kandala NB, Currie A, Peile E, Stranges S, Miller MA. Meta-analysis of short sleep duration and obesity in children and adults. *Sleep*. 2008 May;31(5):619-26.
- 6: Vgontzas AN, Zoumakis E, Bixler EO, Lin HM, Follett H, Kales A, Chrousos GP. Adverse effects of modest sleep restriction on sleepiness, performance, and inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 May;89(5):2119-26.
- 7: Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Regan MM, Price NJ, Dinges DF, Mullington JM. Effect of sleep loss on C-reactive protein, an inflammatory marker of cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Feb 18;43(4):678-83.
- 8: van Leeuwen WM, Lehto M, Karisola P, Lindholm H, Luukkonen R, Sallinen M, Härmä M, Porkka-Heiskanen T, Alenius H. Sleep restriction increases the risk of developing cardiovascular diseases by augmenting proinflammatory responses through IL-17 and CRP. *PLoS One*. 2009;4(2):e4589.
- 9: Irwin MR, Wang M, Ribeiro D, Cho HJ, Olmstead R, Breen EC, Martinez-Maza O, Cole S. Sleep loss activates cellular inflammatory signaling. *Biol Psychiatry*. 2008 Sep 15;64(6):538-40.

- 10: Basheer R, Rainnie DG, Porkka-Heiskanen T, Ramesh V, McCarley RW. Adenosine, prolonged wakefulness, and A1-activated NF-kappaB DNA binding in the basal forebrain of the rat. *Neuroscience*. 2001;104(3):731-9.
- 11: Mullington JM, Simpson NS, Meier-Ewert HK, Haack M. Sleep loss and inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2010 Oct;24(5):775-84.
- 12: Meri S, Julkunen I. Mikrobirakenteita tunnistavat luontaisen immunitietin reseptorit. In: Hedman K, Heikkinen T, Huovinen P, Järvinen A, Meri S, Vaara M. (eds.) *Immunologia*. Suomi: Kustannus oy Duodecim; 2011. p 42-45.
- 13: Yatim KM, Lakkis FG. A brief journey through the immune system. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015 Jul 7;10(7):1274-81.
- 14: Majde JA, Krueger JM. Links between the innate immune system and sleep. *J Allergy Clin Immunol* 2005 Dec;116(6):1188-1198.
- 15: Aho V, Ollila HM, Rantanen V, Kronholm E, Surakka I, van Leeuwen WM, et al. Partial sleep restriction activates immune response-related gene expression pathways: experimental and epidemiological studies in humans. *PLoS ONE* [Electronic Resource] 2013;8(10):e77184.
- 16: Wigren H-K, Stenberg T. Kuinka nukkuminen elvyttää aivojamme? *Lääketieteellinen aikakauskirja Duodecim* 2015;131(2):151-6
- 17: Saper CB, Scammell TE, Lu J. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 2005 Oct 27;437(7063):1257-63.
- 18: Porkka-Heiskanen T, Zitting KM, Wigren HK. Sleep, its regulation and possible mechanisms of sleep disturbances. *Acta Physiol (Oxf)*. 2013 Aug;208(4):311-28.
- 19: Niedermeyer E, da Silva FL. *Electroencephalography: Basic principles, Clinical Applications, and Related Fields*. : Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
- 20: Conrad I, Ancoli-Israel S, Chesson AL, Quan SF. *The AASM manual for the Scoring of Sleep and Associated Events*. 2007.
- 21: Irwin MR, Opp MR. Sleep Health: Reciprocal Regulation of Sleep and Innate Immunity. *Neuropsychopharmacology*. 2017 Jan;42(1):129-155.
- 22: Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev*. 1999 Jan;79(1):1-71.

- 23: Gruys E, Toussaint MJ, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005 Nov;6(11):1045-56.
- 24: Ishimori K. True causes of sleep: A hypnogenic substance as evidenced in the brain of sleep-deprived animals. *Tokyo Igakki Zasshi*. 1909;23:429–457.
- 25: Legendre R, Pieron H. Recherches sur le besoin de sommeil consécutive à une veille prolongée. *Z allg Physiol*. 1913;14:235–262
- 26: Zielinski MR, Krueger JM. Sleep and innate immunity. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011 Jan 1;3:632-42.
- 27: Krueger JM. The role of cytokines in sleep regulation. *Curr Pharm Des*. 2008;14(32):3408-16.
- 28: Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011 Apr 7;117(14):3720-32.
- 29: Swardfager W, Lanctôt K, Rothenburg L, Wong A, Cappell J, Herrmann N. A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2010 Nov 15;68(10):930-41.
- 30: Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):487-501.
- 31: Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, Lanctôt KL. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*. 2010 Mar 1;67(5):446-57.
- 32: Victor FC, Gottlieb AB. TNF-alpha and apoptosis: implications for the pathogenesis and treatment of psoriasis. *J Drugs Dermatol*. 2002 Dec;1(3):264-75.
- 33: Brynskov J, Foegh P, Pedersen G, Ellervik C, Kirkegaard T, Bingham A, Saermark T. Tumour necrosis factor alpha converting enzyme (TACE) activity in the colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 2002 Jul;51(1):37-43.
- 34: Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003 Jan;10(1):45-65.
- 35: Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 24;91(11):4854-8.

- 36: Turer EE, Tavares RM, Mortier E, Hitotsumatsu O, Advincula R, Lee B, Shifrin N, Malynn BA, Ma A. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J Exp Med*. 2008 Feb 18;205(2):451-64.
- 37: Ratsimandresy RA, Dorfleutner A, Stehlik C. An Update on PYRIN Domain-Containing Pattern Recognition Receptors: From Immunity to Pathology. *Front Immunol*. 2013 Dec 9;4:440
- 38: Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci*. 2014 Jun;1319(1):82-95.
- 39: Chennaoui M, Sauvet F, Drogou C, Van Beers P, Langrume C, Guillard M, Gourby B, Bourrilhon C, Florence G, Gomez-Merino D. Effect of one night of sleep loss on changes in tumor necrosis factor alpha (TNF- α) levels in healthy men. *Cytokine*. 2011 Nov;56(2):318-24.
- 40: Liu TZ, Xu C, Rota M, Cai H, Zhang C, Shi MJ, Yuan RX, Weng H, Meng XY, Kwong JS, Sun X. Sleep duration and risk of all-cause mortality: a flexible, non-linear, meta-regression of 40 prospective cohort studies. *Sleep Med Rev* 32: 28–36, 2017.
- 41: Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, Benveniste H, Vates GE, Deane R, Goldman SA, Nagelhus EA, Nedergaard M. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*. 2012 Aug 15;4(147):147ra111.
- 42: Boespflug EL, Iliff JJ. The Emerging Relationship Between Interstitial Fluid-Cerebrospinal Fluid Exchange, Amyloid- β , and Sleep. *Biol Psychiatry* 83: 328–336, 2018.
- 43: Meerlo P, Sgoifo A, Suchecki D. Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Med Rev*. 2008 Jun;12(3):197-210.
- 44: Simpson NS, DiIombi M, Scott-Sutherland J, Yang H, Bhatt V, Gautam S, Mullington J, Haack M. Repeating patterns of sleep restriction and recovery: do we get used to it? *Brain Behav Immun* 58: 142–151, 2016.
- 45: Baker FC, Driver HS. Circadian rhythms, sleep, and the menstrual cycle. *Sleep Med*. 2007 Sep;8(6):613-22.